

速報

油脂植物 *Jatropha curcas* L. の遺伝子組換え系の確立*¹笠置千晶*² ・ 玉泉幸一郎*³キーワード: *Jatropha curcas* L., 遺伝子組換え, 再分化

I. はじめに

地球温暖化が環境問題として注目されてきたことにより, 化石燃料の代替材として植物を資源としたバイオディーゼルの開発が進められている。バイオディーゼルは二酸化炭素を吸収して育つ植物から生産されるため, 長期的な二酸化炭素排出量が±0になること, また, 自動車燃料として利用したとき, 軽油と比べて排気ガスがクリーンであるなどの利点がある。現在, 菜種油やヒマワリ油, 大豆油, コーン油など植物油を原料としたバイオディーゼルの開発, 普及が進められている。

Jatropha curcas L.(ナンヨウアブラギリ) は亜熱帯から熱帯に生息する低木で, バイオディーゼル原料として注目されている。成長が早く, 2~5年で種子生産を開始し, 約50年間生産する。種子は30~40%の油を含み燃料用油に適している。また, 耐乾性に優れ, 貧栄養地でも生育可能であり, 緑化材料としても期待されている。

Jatropha の組織培養に関する研究は, 再分化と増殖 (1), (2) の報告があるが, 遺伝子組換えの報告はない。遺伝子組換えが可能になれば, 油量の増加や油質の改変あるいは生育環境の改変など経済的・環境的価値を高めることが期待できる。そこで, 今回は *Jatropha* の遺伝子組換え系の確立を目的として実験を行った。

II. 材料と方法

1. 種子の発芽

種子はインドネシアで採取したものをを用いた。種子の表面をアルコールで殺菌し, 3%次亜塩素酸で10分間滅菌した後, 滅菌水でよく洗浄した。これらの種子は乾燥後, 種皮を除去し発芽用培地に植えつけた。発芽用培地は1/2MSにシヨ糖20g/Lを加え, 支持材はゲルライト2.4g/Lを用いた。

2. 再分化

1週間目の発芽種子から胚軸と葉を切り離し, 胚軸は0.5~1cmに, 葉は0.5cm×0.5cmに切断し, 置床した。これらは1ヵ月後に分化率を記録した。基本培地はMSとし, シヨ糖20g/Lを加え, 支持材は寒天5g/Lとした。ホルモンはBAP1μM, 2μM

MにIBA, IAA, 2.4-Dをそれぞれ0, 1, 3μM加えた14種類を用意した(表-1)。

3. 遺伝子組換え

遺伝子組換えはアグロバクテリウム法を用いて行った。無菌播種した *Jatropha* を0.5~1cmに切断し, GFP遺伝子, カナマイシン耐性遺伝子を導入したアグロバクテリウムを感染させた。感染には, LBA4404/CR21と感染性の強いEHA105/CR21の2種類の菌株を用いた。その後3日間共存培地で暗黒培養後, 各種抗生物質を含むカナマイシン耐性選択培地で培養を行った。抗生物質はカナマイシン50mg/Lに, CarbenicillinまたはVancomycinをそれぞれ250, 500, 750mg/Lを加えた計6種類で行った。基本培地はMSとし, シヨ糖20g/Lを加え, 支持材はゲルライト2.4g/Lとした。ホルモンはBAP2μM, IBA1μMを加えた。

4. GFP分析

再分化培地で培養したカルスを蛍光顕微鏡で観察し蛍光の有無を確認した。

5. PCR分析

GFP蛍光の観察された形質転換カルス80mgからDNAを抽出し, genomic PCR分析によりGFP遺伝子の有無を確認した。

III. 結果と考察

1. 再分化

置床した植物片から, 白色カルスの形成が見られ, 1ヶ月後にはカルスが緑変し, 緑変部から不定芽が分化した。再分化はBAP2μMとBAP2μM+IAA1μMの2つの培地で見られ, BAP+IBAで最も再分化率の高かった文献とは異なる結果となった。胚軸での分化率はそれぞれ7%と0%, 葉での分化率は50%と17%であった(表-2, 3, 図-1)。今回の結果では, 胚軸よりも葉の方が高い再分化率が得られた。

2. 遺伝子組換え

GFP分析では, GFP遺伝子が導入されているカルスで緑色の蛍光が観察された(図-2)。抗生物質としてCarbenicillinを加えたもので発現率が高く, 使用した濃度では高い濃度ほど発現率が高くなる傾向にあった(表-4)。一方Vancomycinでは発現

*¹ Chiaki, K. and Koichiro, G.: Studies on the gene-transfer of *Jatropha curcas* L.*² 九州大学農学部 Fac., Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812-0053*³ 九州大学大学院農学研究院 Fac. Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

率が低く、さらに EHA105/CR21 で感染したものでは全て枯死した。

蛍光カルスはカルスの増殖は認められたがカルスからの不定芽の分化は生じなかった。これは、カルスがアグロバクテリウムの感染により弱ったことや、抗生物質による成長阻害などが原因として考えられる。

PCR 分析では、GFP の蛍光が強かったカルス10個体を材料として、これらから DNA を抽出して行った。10個体全てにおいて、GFP 遺伝子の増幅が確認された (図-3)。このことより、これらの蛍光カルスには GFP 遺伝子が導入していることが確認された。

IV. おわりに

再分化系においては、再分化に適した外植体と培地を探索する

ことができた。しかしながら、シュートの伸長量は認められず植物体は再生されなかった。今後は、再分化後のシュート伸長に適した培地探索が必要である。

遺伝子組換えにおいては、アグロバクテリウム法による遺伝子の導入が可能であることが明らかになった。今後は、遺伝子組換えカルスからの植物体再生のための検索を行い、遺伝子組換え体を作成することが重要である。

引用文献

- (1) M. Sujatha and N. Mukta (1996) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44 : 135-141.
- (2) M. Sujatha and A. J. Prabhakaran (2003) Genetic Resources and Crop Evolution 50 : 75-82.

(2007年11月19日受付；2008年1月17日受理)

表-1. 再分化におけるホルモン濃度

培地の種類	BAP	IBA	IAA	2.4-D
1	1*	0	0	0
2	1	1	0	0
3	1	0	1	0
4	1	0	0	1
5	1	3	0	0
6	1	0	3	0
7	1	0	0	3
8	2	0	0	0
9	2	1	0	0
10	2	0	1	0
11	2	0	0	1
12	2	3	0	0
13	2	0	3	0
14	2	0	0	3

*数字はそれぞれのホルモンの濃度 (μ M) を表す。

表-2. 胚軸を用いたものの再分化数 (%)

μ M	なし	IBA1*	IBA3	IAA1	IAA3	2.4-D1	2.4-D3
BAP 1	0	0	0	0	0	0	0
BAP 2	7	0	0	0	0	0	0

*数字はそれぞれのホルモンの濃度 (μ M) を表す。

表-3. 葉を用いたものの再分化数 (%)

μ M	なし	IBA1*	IBA3	IAA1	IAA3	2.4-D1	2.4-D3
BAP 1	0	0	0	0	0	0	0
BAP 2	50	0	0	17	0	0	0

*数字はそれぞれのホルモンの濃度 (μ M) を表す。

表-4. GFP 分析における組換え率 (%)

	Va250*	Va500	Va750	Ca250	Ca500	Ca750
LBA4404	10	17	30	47	40	54
EHA105				45	64	73

*数字はそれぞれの抗生物質濃度 (mg/L) を表す。

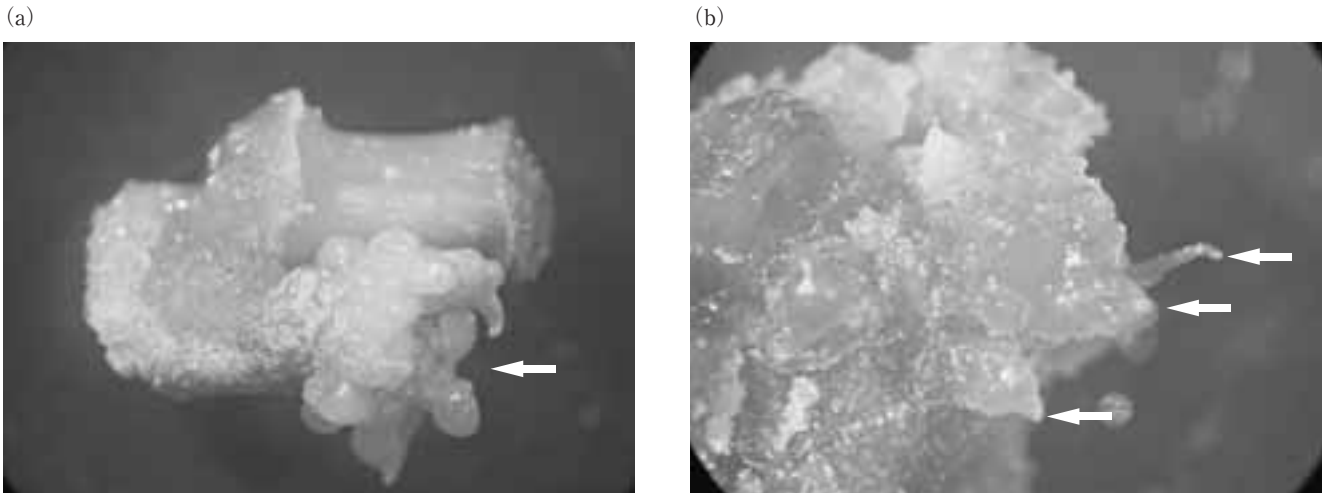


図-1. 再分化による芽の発生
(a) 胚軸からの再分化
(b) 葉からの再分化

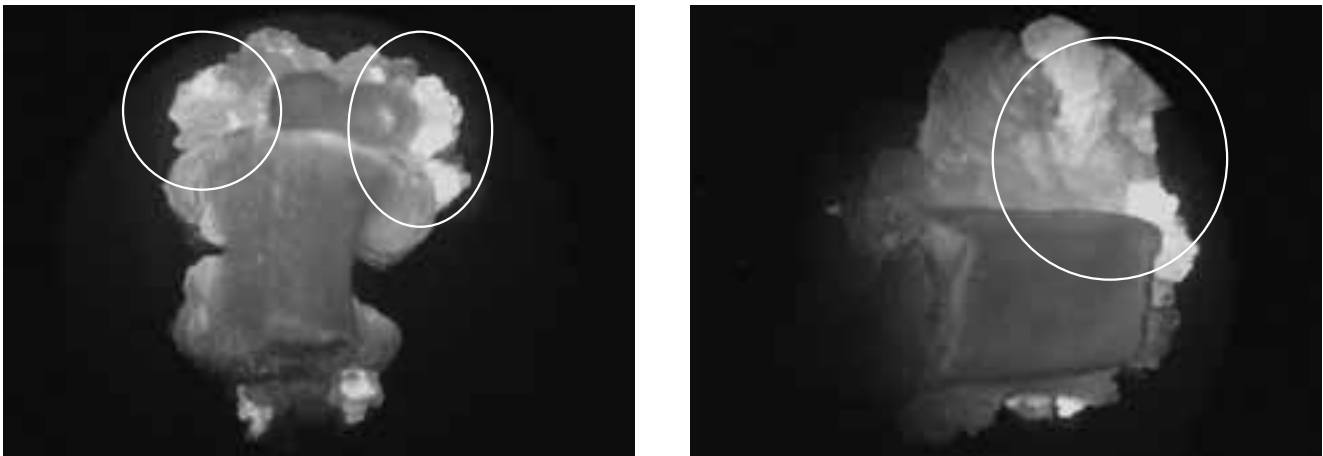


図-2. GFP 遺伝子による蛍光発現

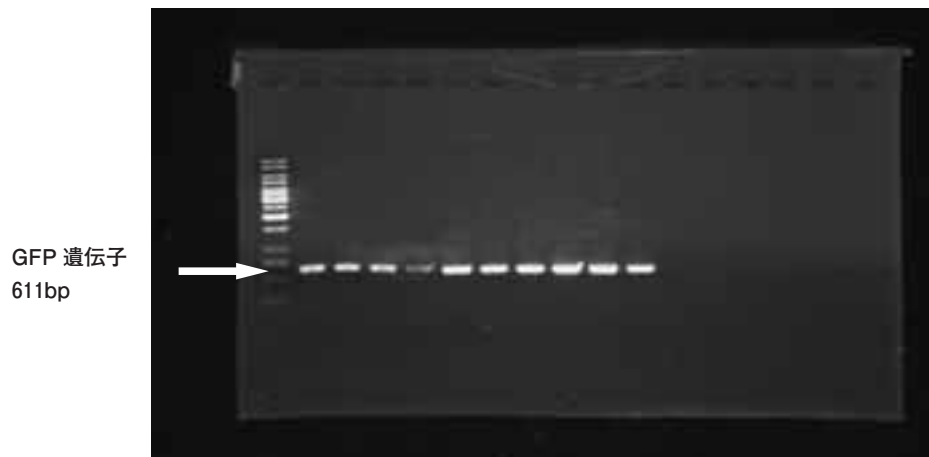


図-3. PCR 分析結果
分析した10個全てにおいて GFP 遺伝子である611bp
にバンドが確認された。